



**Universidad
de La Laguna**



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Generación de una colección de referencia del barcode genético de Tenebrionidae (Coleoptera) en las Islas Canarias

DNA barcoding of Tenebrionidae (Coleoptera) from the Canary Islands

Natalia Rivero Sanz
Facultad de Biología
Grado en Biología

Septiembre 2022

Tutores:

Nuria Macías Hernández - Universidad de La Laguna

Víctor Nogueras Rodríguez - Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC)

1. Resumen

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es la creación de una base de datos de secuencias de ADN (fragmento *barcode*) para el grupo Tenebrionidae (Coleoptera) donde se incluirán las diferentes especies con las que se ha trabajado, para ello se utilizaron repositorios online de secuencias de barcode de ADN. Se empleó la colección de invertebrados identificados y conservados en alcohol del Departamento de Zoología de la Universidad de La Laguna, inicialmente conformada por 293 ejemplares de la familia Tenebrionidae. De todos ellos, se seleccionaron 95 individuos correspondientes a 14 géneros y se obtuvo la secuencia de ADN para el gen citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) mediante PCR, la cual fue amplificada y posteriormente se secuenció. Una vez obtenida su secuencia se comparó con las secuencias de los repositorios online de las bases de datos BOLD y GenBank. A nivel de familia, en ambas bases de datos, la coincidencia era del 100%. A nivel de género y especie, la coincidencia oscilaba entre 90-95%. Hemos obtenido 70 nuevas secuencias en BOLD y 68 en GenBank. Este resultado se explica puesto que no hay datos representativos de las Islas Canarias, como consecuencia de que estudios anteriores no se secuenció la región COI del *barcode*, sino otro fragmento (Citocromo b). Por tanto a la hora de buscar en las bases de datos de BOLD y GenBank las identificaciones moleculares no coinciden con las taxonómicas.

Palabras clave: Biodiversidad, Coleoptera, diversidad críptica, ADN *barcoding*, Islas Canarias, Tenebrionidae

2. Abstract

The main objective of this Final Degree Project is to develop a database where the different species which we have worked with will be included. We will compare our sequences with online repositories of DNA barcode sequences. A collection of identified and alcohol - preserved invertebrates from the Departamento de Zoología de la Universidad de la Laguna was used, which initially was made up of 293 specimens from the Tenebrionidae family. From all of them, 95 specimens of 14 different genera were selected to obtain the DNA sequence for the cytochrome oxidase subunit 1 (COI) by PCR. A fragment of this mitochondrial gene was amplified and subsequently sequenced. The obtained sequences were compared with other sequences from online repositories in BOLD and GenBank databases. At the family level, there was a 100% of coincidence between the samples in both databases, although at genus and species level the coincidence between the samples ranged from 90 to 95% of similarity. In this Final Degree Project, we obtained 70 new sequences not present in BOLD database, and 68 new sequences in GenBank database. This results can be explained because of the lack of representative data of this coleoptera Family in the Canary Islands, as a consequence of the use of the Cytochrome b fragment of the barcode instead of the COI region. Thus, it may explain why the molecular identifications do not match with the taxonomic ones when looking up in BOLD and GenBank databases

Keywords: Biodiversity, Canary Islands, Coleoptera, cryptic diversity, DNA barcoding, Tenebrionidae

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	4
4. Objetivos	9
5. Material y métodos.....	9
5.1. Obtención de las muestras	
5.2. Selección de especímenes	
5.3. Toma de fotografías	
5.4. Trabajo de laboratorio	
5.5. Tratamiento de datos	
6. Resultados y discusión.....	15
7. Conclusiones.....	24
8. Conclusions.....	25
9. Bibliografía.....	26

3. Introducción

Definición biodiversidad

La biodiversidad es toda variación de la base hereditaria en todos los niveles jerárquicos de organización biológica, desde los genes en una población local o especie, hasta las especies que componen toda o una parte de una comunidad local, y finalmente en las mismas comunidades que componen la parte viviente de los múltiples ecosistemas del mundo ([Wilson, 1997](#)).

La Convención sobre la Diversidad Biológica (1992) es considerada el acuerdo internacional más importante para el mantenimiento y la conservación de la biodiversidad. El marco de referencia que provee dicha Convención es un intento por registrar el impacto perjudicial de la actividad humana en la biodiversidad, constituyéndose en un compromiso histórico de las naciones del mundo. Es la primera vez que la biodiversidad se presenta en un tratado unificador y global y se reconoce como un interés común de la humanidad ([Gaston y Spicer, 1998](#)).

La biodiversidad tiene numerosas implicaciones funcionales incluyendo la capacidad para proveer alimentos, medicamentos, materias primas y energía, así como regulación de la calidad del aire, erosión y desastres naturales, lo que asegura la supervivencia de plantas y animales, y por tanto de nuestra propia especie

Código de barras genético o *barcoding*

La taxonomía es la disciplina encargada de la clasificación de los organismos en un sistema de categorías jerárquicas, basado en caracteres informativos, cuya función es reflejar las relaciones filogenéticas existentes entre ellos ([Wilson, 1985](#); [Winston, 1999](#); [Wheeler, 2008](#)).

Desde finales de la década de los 80 la diversidad global es todavía desconocida, existen alrededor de 1,7 millones de especies descritas, sin embargo el número estimado de especies sin describir oscila entre 5 y 50 millones ([Chapman, 2009](#); [Mora et al., 2011](#)). Esta discrepancia pone de manifiesto nuestro escaso conocimiento sobre la biodiversidad global, una cuestión donde las actuales técnicas moleculares -como el código de barras del ADN (*DNA barcoding*)- pueden aportar prometedoras respuestas. Esta herramienta es muy útil porque nos permite delimitar especies de géneros conocidos y descubrir nuevas especies ([Hebert y Gregory, 2005](#)).

El *barcode* genético o código de barras genético es una herramienta molecular que permite identificar y descubrir especies empleando una sección corta de la molécula de ADN procedente de una región del genoma mitocondrial ([Frézal & Leblois, 2008](#)). La región del gen empleada como *barcode* para Metazoa es una región de aproximadamente 648 pares de bases (pb) del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad 1 (COX1), cuyo uso como se ha estandarizado en la identificación de aves, peces, insectos y otros grupos de animales ([Herbert et al., 2003](#)). Más allá de su valor taxonómico, esta técnica presenta numerosas implicaciones en diferentes campos como la ecología, evolución, y biología de la conservación. Sin embargo, aunque es muy útil en diferentes situaciones como identificación de material biológico incompleto, identificación de estadios larvarios, restos fósiles, las inferencias obtenidas de DNA *barcoding* pueden estar limitadas por la inexactitud y la calidad en las identificaciones específicas de las bases de datos de secuencias de referencias, que son incompletas y sesgadas hacia determinados grupos de organismos y regiones geográficas. Por ello es muy importante que ambas técnicas (morfología y molecular) sean utilizadas de forma comparativa y complementaria a nivel de organismo ([Noriega et al., 2015](#)).

Diversidad de insectos

Los insectos representan una gran proporción de la biodiversidad total del planeta. Se calculan alrededor de 1 millón de especies de insectos, sin embargo se cree que debe haber alrededor de 5,5 millones de especies si contamos las no descritas ([Stork et al., 2018](#)). Los insectos han sido muy utilizados en estudios de conservación y como indicadores biológicos, debido a que se trata de organismos que, en general, son fáciles de coleccionar ([Favero et al., 2010](#)).

Los insectos juegan un importante papel en los ecosistemas y en los seres vivos. Desempeñan un papel esencial en la polinización, descomposición de residuos, procesos de formación del suelo y del reciclaje de nutrientes, en las cadenas tróficas como presas o como depredadores y parasitoides, actuando en la lucha biológica contra especies plaga, lo que reduce la necesidad de aplicación de insecticidas ([Ornosa et al., 2021](#)). También proporcionan alimentos y otros productos como biocombustibles o fibras, y son esenciales en los medios dulceacuícolas, en ríos, lagos, etc., donde son bioindicadores de calidad, al ser sensibles a la alteración de las aguas. Estos y muchos otros servicios irremplazables suelen ser desconocidos por la sociedad. En ocasiones también son infravalorados o menospreciados. Esta percepción negativa es errónea e injusta, ya que menos de un 2 % de los

insectos pueden causar problemas como transmisión de enfermedades, daños a plantas, etc. ([Zumbado-Arrieta y Azofeifa-Jiménez, 2018](#)).

En Canarias, la fauna actual de artrópodos es rica y no parece disminuida en cuanto al número total de especies comparado con otras zonas continentales, sin embargo sí de órdenes o de familias (Tabla 1). La diversidad según la Base de Datos de Biodiversidad de Canarias (corregida con datos inéditos aportados por los autores) es de 7.702 especies para todo el archipiélago, una riqueza considerable para un territorio de tan sólo 7.492 km². De todas estas especies se estima que unas 627 han sido introducidas por la actividad humana, especialmente tras la llegada de los europeos en el siglo XV, y sobre todo en los últimos dos siglos con el aumento de los transportes y el comercio. Los nichos ecológicos vacíos como consecuencia de que las especies continentales han sido incapaces de colonizar las islas ha dado lugar a múltiples radiaciones adaptativas de especies (e.g. género de arañas *Dysdera*), un fenómeno en el que la variabilidad ambiental, climática y altitudinal de las islas ha contribuido positivamente. A su vez, procesos de colonización independiente de las islas, promovidos en parte por la amplia distancia geográfica entre algunas de estas, han contribuido a la diversificación de algunos grupos taxonómicos (especiación alopátrica; e.g. género de coleópteros *Tarphius*). Así los factores biogeográficos e históricos han influido en la evolución, de tal forma que un género puede tener especies endémicas diferentes en distintas islas, en distintos hábitats de una misma isla o incluso en el mismo hábitat ([Oromí et al., 2015](#)).

Hay distintos parámetros que determinan la relación entre la ontogenia y distribución de las especies en las islas como son el tamaño, el cual determina la capacidad de carga de la isla, la edad que determina la mayor riqueza la especies a mayor edad, el aislamiento geográfico que determina un mayor grado de endemidad a mayor aislamiento ([Del Arco Aguilar et al., 2018](#))

Tabla 1. Artrópodos terrestres de la fauna de Canarias (datos actualizados a partir del Banco de Datos de Biodiversidad de Canarias - BIOTA)

	ESPECIES			
	INTRODUCIDAS	NO ENDÉMICAS	ENDÉMICAS	TOTAL
Arácnidos	83	502	472	1057
Miriápodos	30		66	142
Crustáceos	29		93	184
Héxapodos	728	3429	2489	6646
Artrópodos	870	4039	3120	8029

La diversidad biológica y ecológica de los coleópteros es extraordinaria. Taxonómicamente constituyen más del 40% de la diversidad descrita para Hexapoda a nivel mundial, con aproximadamente 420.000 especies descritas a la fecha ([Lawrence y Ślipiński, 2013](#)). Los Tenebrionidae son una familia de coleópteros formada por unas 20.000 especies de tamaño que oscila entre 2 y 80 mm de longitud. La forma del cuerpo es variable desde alargada y delgada hasta convexa y muy robusta o aplanada. La mayoría de especies son de color pardo oscuro o negro, sin embargo, otras presentan marcas de colores llamativos. Dentro de la familia Tenebrionidae podemos encontrar géneros representativos como *Arthrodeis*, *Pimelia*, *Hegeter*, *Nesotes*. *Pimelia granulicollis* es un endemismo canario, escarabajo no volador, grande (15-10 mm), cuerpo abombado y color negro mate. La cabeza es pequeña, sus patas son gráciles, con pelosidad en los fémures de los tres pares de patas. Ocasionalmente algunos individuos presentan esta característica pelosidad en la base de los élitros (alas rígidas externas), presenta pequeñas manchas muy ocasionales junto al ápice de los élitros, estos son muy lisos al carecer de costillas elitrales en el disco, escudete mesotorácico oculto por delante de los élitros. Se diferencia de *P. sparsa* ssp. *albohumeralis* y ssp. *serrimargo*, por la presencia de la pelosidad en las patas y por no presentar el escudete visible ([BIOTA, 2009](#)). *Arthrodeis obesus* es un endemismo canario, escarabajo mediano entre los 9.3 y 11.8 mm y de coloración negra. A simple vista destacan la cabeza y el protórax más brillantes que los élitros (alas rígidas externas), en los que se observa una rugosidad manifiesta que los hace más mates, y con unas diminutas grietas sin dirección fija en toda la superficie. Tiene, además, una escotadura muy acentuada entre las mejillas y el epistoma (zona entre la antena y la boca), la puntuación de la cabeza, incluido mandíbula y epistoma, es notablemente gruesa y profunda. Los dientes de las tibias anteriores están bien desarrollados, ya que son animales psamófilos. La quilla frontal está bastante marcada, apreciándose otra quilla más atenuada, perpendicular a ésta, sobre el diente central del epistoma ([BIOTA, 2007](#)).

Marco geográfico de estudio: Las islas Canarias

Las Islas Canarias son un archipiélago oceánico atlántico, situado sobre una placa oceánica en lento movimiento, cerca de un margen continental pasivo, frente al noroeste de África ubicado entre 13°20'–18°10'W y 27°37'–29°25'N (Figura 1). Está formado por siete islas habitadas principales: de Este a Oeste son Lanzarote, Fuerteventura, Gran Canaria, Tenerife, La Gomera, La Palma y El Hierro. A estas se suman los islotes y componentes rocosos del llamado Archipiélago Chinijo, situado en su sector Este al Norte de Lanzarote; de

mayor a menor tamaño son La Graciosa, Alegranza, Montaña Clara, Roque del Este y Roque del Oeste; el pequeño islote de Lobos entre Fuerteventura y Lanzarote, y una serie de rocas *offshore* de pequeña superficie. Se trata de uno de los archipiélagos más estudiados desde un punto de vista geológico, sin embargo carece aún de modelos para explicar el origen volcánico comparablemente claros a los establecidos para la mayoría de las islas volcánicas oceánicas. Todas las Canarias juntas tienen una superficie de unos 7492 km². La isla de mayor altitud (3718 m; Teide) y de mayor superficie es Tenerife (2034 km²) y la más pequeña El Hierro (268,7 km²). Las islas más antiguas son las más orientales (Fuerteventura, Lanzarote y Gran Canaria) que tienen mayor altitud y menor complejidad topográfica s; mientras que las islas occidentales son Tenerife, La Gomera, La Palma y El Hierro, las diferencias en la complejidad topográfica así como la altitud explican parte de las diferencias en el número de especies que alberga cada isla (Del Arco Aguilar *et al.*, 2018).

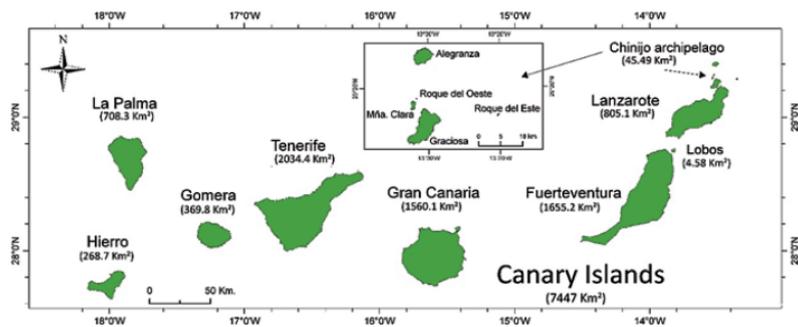


Figura 1. Mapa de las islas Canarias. Fuente: Libro Vegetation of the Canary islands

Las islas forman un grupo apiñado, con distancias entre sí que no superan los 57 kilómetros de media, cuya mayor distancia entre islas contiguas son los 85 kilómetros que separan el sur de Fuerteventura del este de Gran Canaria. Al Norte del Archipiélago, las únicas tierras emergidas son las islas Salvajes y Madeira, situadas a poco más de 400 km, mientras que al Sur, el archipiélago de Cabo Verde se encuentra a 1.300 kilómetros de distancia. Los otros dos límites son el desierto del Sáhara, al Este, y la inmensidad oceánica del Atlántico, al Oeste (Morales, 2001).

Los orígenes del archipiélago suscitan la controversia: un punto caliente del manto, una zona de deformación litosférica, una región de fallas en bloques por compresión o una fractura que se propaga hacia el oeste han sido citados por diferentes autores como el origen último del archipiélago (Carracedo *et al.*, 1998).

4. Objetivos

Este Trabajo de Fin de Grado (TFG) tiene como objetivo la obtención del *barcode* genético de varias especies de coleópteros (familia Tenebrionidae) presentes en Canarias, con el cual poder generar una base de datos de referencia de secuencias *barcodes* de la familia Tenebrionidae en las islas.

5. Materiales y métodos

5.1. Obtención de las muestras

Las muestras sobre las que se trabajan pertenecen a la colección entomológica del Departamento de Zoología de la Universidad de la Laguna (DZUL), cuyos especímenes forman parte del nódulo GBIF —Infraestructura Mundial de Información en Biodiversidad— es una organización internacional y una red de datos financiada por gobiernos de todo el mundo, destinada a proporcionar a cualquier persona, en cualquier lugar, acceso abierto y gratuito a datos sobre cualquier tipo de forma de vida que hay en la Tierra (*GBIF*, s. f.). Los especímenes seleccionados para la realización de este trabajo fueron colectados por el Profesor Pedro Oromí durante los últimos 20-30 años, y han estado conservados a -20°C en etanol 70-100% desde su recolección.

5.2. Selección de especímenes

Teniendo en cuenta las muestras que había conservadas en el departamento se tomaron inicialmente 293 ejemplares, y la selección final fue de 95 individuos, correspondientes a 14 géneros. Se tuvieron en cuenta diferentes criterios para la selección de los ejemplares, maximizando que estuvieran representados la mayor parte de géneros y especies disponibles de cada una de las islas, que el año de recolección fuera reciente, o que las especies seleccionadas correspondieran a distintas islas para poder observar si había diferencias entre estas o si se trataba de especies crípticas.

5.3 Toma de fotografías

Se tomaron fotografías de todos los ejemplares utilizados, empleando una cámara digital (Canon) y una lupa con cámara de alta resolución incorporada (Motic SMZ-171-TLED MOTICAM S12). Esto nos permitirá disponer de una base de fotografías

para futuras identificaciones y subir las fotos a BOLD junto con su secuencia correspondiente.

5.4. Trabajo de laboratorio

Extracción y cuantificación de ADN

El ADN se extrajo de una pata, si se trataba de un espécimen de dimensiones grandes (tamaño de cuerpo > 20 mm), si el ejemplar era más pequeño, se tomaban dos patas para asegurar que había ADN suficiente en el tejido para llevar a cabo la extracción de ADN. Se llevó a cabo empleando el kit comercial Omega Mag-Bind® M6399 y el robot KingFisher Flex. Este kit está basado en partículas magnéticas y nos permite trabajar con muestras que puedan estar algo deterioradas, puesto que minimiza las contaminaciones. La extracción de ácidos nucleicos (ARN y ADN) mediante el método de perlas magnéticas se basa principalmente en hibridación complementaria entre el ácido nucleico y las perlas, para su posterior aislamiento mediante campos magnéticos. Las principales ventajas de este método en comparación a métodos manuales basados en columnas son: la minimización de contaminaciones por error y mayor pureza y cantidad de ADN recuperado. Se incorporó un control negativo de extracción para asegurar de que no había contaminación durante el proceso. La calidad y concentración de ADN (ng/ul) fue cuantificada mediante espectrofotometría empleando el instrumento Infinite M Nano+ (Tecan).

Amplificación del fragmento de gen citocromo oxidasa subunidad 1(COI) mediante PCR

Para la amplificación del fragmento de gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la enzima citocromo c oxidasa (COI) se emplearon los cebadores *Foldegen-F* (TCNACNAAYCAYAARRAYATYGG) y *Foldegen-R* (TANACYTCNNGGRTGNCCRAARAAYCA) (Yu *et al.*, 2012). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador (BioRad T100) en un volumen total de 20 ul, siendo los reactivos empleados los detallados en la Tabla 2. Las condiciones de la amplificación consistieron en una fase inicial de desnaturalización a 95°C (4'), seguida de 42 ciclos en los que se alternaron fases desnaturalización (95°C durante 45''), hibridación (46°C, durante 45'') y elongación (72 °C, durante 90''). Tras los 42 ciclos, hubo una fase final de elongación a 72 °C durante 10 minutos. Se incluyó un control negativo de PCR, que no contiene la muestra, con el objetivo de verificar que no hay contaminación en los reactivos, ni

durante la manipulación. Hubo muestras que se tuvieron que repetir cambiando las condiciones de la PCR, básicamente añadiendo más μl de ADN o diluyendo el ADN.

Tabla 2. Reactivos y volúmenes empleados en la PCR

	x 1 muestras
H ₂ O	13,72 <i>ul</i>
Buffer (NH ₄)	2 <i>ul</i>
MgCl ₂	1,2 <i>ul</i>
dNTPs	0,4 <i>ul</i>
BSA	0,4 <i>ul</i>
Foldegen-F	0,6 <i>ul</i>
Foldegen-R	0,6 <i>ul</i>
Taq	0,08 <i>ul</i>

Comprobación de la amplificación del gen COI y secuenciación de ADN

Para asegurarnos que las muestras se han amplificado de forma correcta se emplea la electroforesis, técnica de laboratorio que se usa para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño y carga eléctrica. Se usa una corriente eléctrica para mover las moléculas a través de un gel o de otra matriz. En nuestro caso empleamos un gel de agarosa preparado con 1 g de agarosa disuelto en 125 ml de disolución tampón TBE (Tris/Borato/EDTA), que se calienta hasta su completa disolución y se vierte sobre un molde dejando que solidifique, para ello se colocan unos peines que forman los pozos donde se depositan las muestras. Una vez que el gel de agarosa ha solidificado se introduce en la cubeta de electroforesis asegurando que el TBE la bañe por completo. Se cargan los pocillos con el ADN, el gel RED y el tampón (Figura 2).

Para la visualización de los productos de PCR en el gel de agarosa se empleó GelRed, un colorante fluorescente ultrasensible extremadamente estable y ambientalmente seguro para ácidos nucleicos diseñado para reemplazar el bromuro de etidio (EtBr), altamente tóxico. Al exponerse a luz ultravioleta, emite una fluorescencia con un color naranja que se intensifica al unirse al ADN. La electroforesis se realizó a un voltaje de 80 V durante 40 minutos. Para revelar se emplea el equipo de electroforesis dotado de rayos UV, se sacó una foto para comprobar que cada muestra se amplificaba de forma correcta.

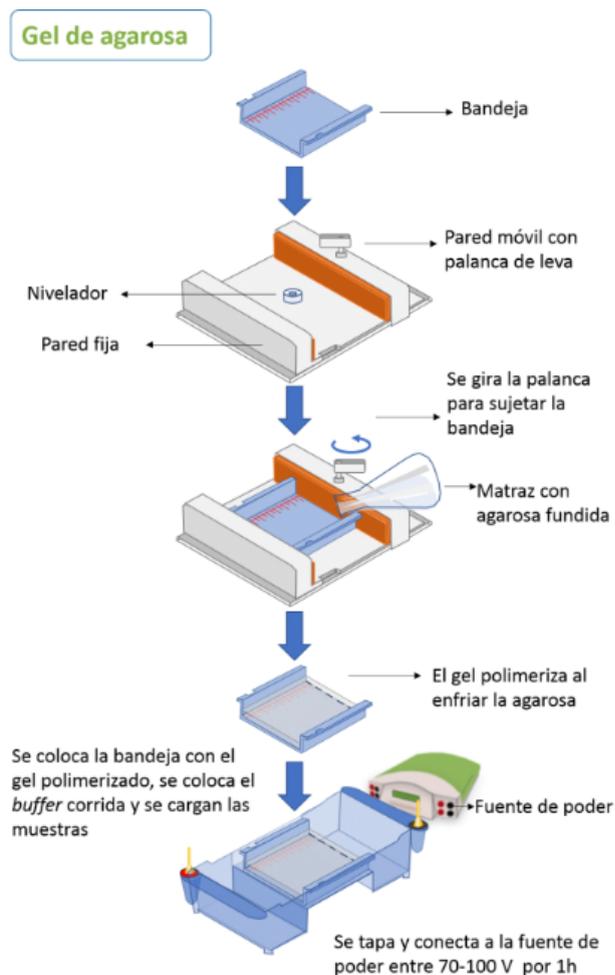


Figura 2. Esquema representado la preparación de un gel de electroforesis. Imagen Alberto Checa

Una vez comprobados los productos PCR mediante gel de electroforesis, se realizó una purificación enzimática de los mismos con el propósito de eliminar los cebadores y enzimas usadas durante la PCR, previa a su envío para secuenciación. La purificación enzimática se realizó mediante el empleo de dos enzimas (Exo1 y rAP), las cuales fueron incubadas a 60°C durante 30 minutos. Al producto resultante se le añadió 5 ul del cebador Foldegen-F y fue enviado a Macrogen para su secuenciación (Figura 3) mediante electroforesis capilar (método Sanger).

PLACA DE SECUENCIACIÓN - 21915AA001 -												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TENE001	TENE009	TENE017	TENE025	TENE033	TENE041	TENE049	TENE057	TENE065	TENE073	TENE081	TENE089
B	TENE002	TENE010	TENE018	TENE026	TENE034	TENE042	TENE050	TENE058	TENE066	TENE074	TENE082	TENE090
C	TENE003	TENE011	TENE019	TENE027	TENE035	TENE043	TENE051	TENE059	TENE067	TENE075	TENE083	TENE091
D	TENE004	TENE012	TENE020	TENE028	TENE036	TENE044	TENE052	TENE060	TENE068	TENE076	TENE084	TENE092
E	TENE005	TENE013	TENE021	TENE029	TENE037	TENE045	TENE053	TENE061	TENE069	TENE077	TENE085	TENE093
F	TENE006	TENE014	TENE022	TENE030	TENE038	TENE046	TENE054	TENE062	TENE070	TENE078	TENE086	TENE094
G	TENE007	TENE015	TENE023	TENE031	TENE039	TENE047	TENE055	TENE063	TENE071	TENE079	TENE087	TENE095
H	TENE008	TENE016	TENE024	TENE032	TENE040	TENE048	TENE056	TENE064	TENE072	TENE080	TENE088	TENE096
	TENE00x	Producto PCR procedente de PCR1.										
	TENE00x	Producto PCR procedente de PCR1 (muestra no rescatada en PCR2) (TENE009, 075, 078)										
	TENE00x	Producto PCR procedente de PCR2 (20 muestras, estrategias "3ul" o "4ul")										
	TENE082	Producto PCR procedente de PCR2 (estrategia "3ul", pocillo 2G)										
	TENE083	Producto PCR procedente de PCR2 (estrategia "diluir + 1ul", pocillo 5E)										
	TENE086	Producto PCR procedente de PCR2 (estrategia "3ul", pocillo 3A)										

Figura 3. Placa de secuenciación

5.5. Tratamiento de datos

Edición y alineamiento de secuencias

Los cromatogramas obtenidos tras el proceso de secuenciación se editaron con el programa Geneious 7.1.3 (Kearse *et al.*, 2012) (Figura 4). Se comprobó la calidad de las secuencias, el valor de calidad mide la probabilidad que una determinada base sea asignada incorrectamente, y se descartaron aquellas que tenían una calidad muy baja para todas las bases. Se recortaron las secuencias eliminando los extremos de las secuencias considerando el valor de parámetro de calidad *Phred*. Se hizo un alineamiento para los géneros *Arthrodeis*, *Hegeter*, *Nesotes* y *Pimelia*, esto permitió comparar las secuencias de diferentes individuos dentro del mismo género, así hemos podido llevar a cabo la edición más precisa, sobre todo cuando las bases eran distintas. En algunas secuencias se observaban dobles picos, esto podía ocurrir por varias razones entre ellas que los productos de PCR no se hayan purificado adecuadamente, en este caso los cebadores residuales de la PCR pueden actuar como cebadores en la reacción de secuenciación.

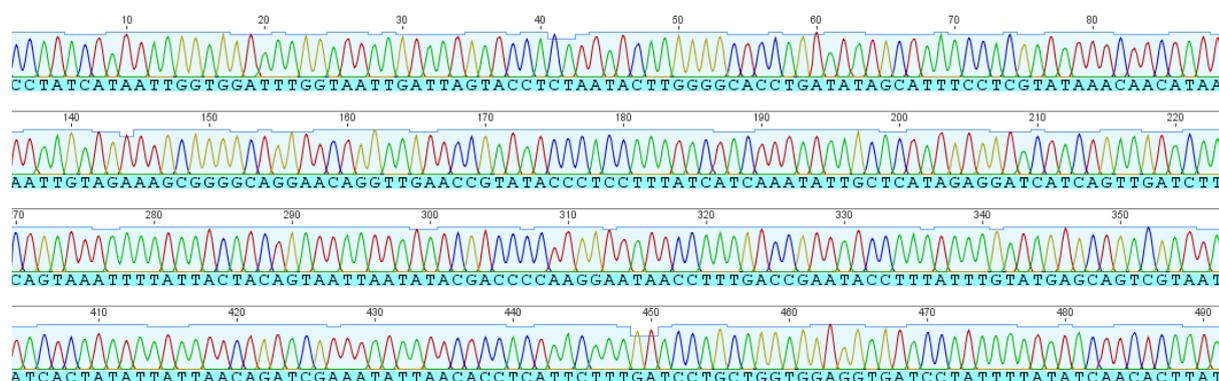


Figura 4. Cromatograma de la secuencia de la muestra *Arthrodeis cf. inflatus*

Comparación de secuencias frente a las bases de datos BOLD y GenBank

Todas las secuencias se comprobaron en las bases de datos del *Barcode of Life Database* (BOLD) ([Ratnasingham et al., 2007](#)) y GenBank ([Benson et al., 2017](#)), para identificar las especies a partir de las secuencias del gen COI y asegurarnos de que ninguna secuencia estaba contaminada, o pertenecía a otra especie, y comprobar el porcentaje de similitud con las secuencias registradas en estas bases de datos. La herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) encuentra regiones de similitud local entre secuencias ([Boratyn et al., 2013](#)). El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con bases de datos de secuencias y calcula la importancia estadística de las coincidencias. BLAST se puede utilizar para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como para ayudar a identificar miembros de familias de genes ([Benson et al., 2017](#)). GenBank es la base de datos diseñada para proporcionar y fomentar el acceso dentro de la comunidad científica a la información de secuencias de ADN más actualizada y completa ([Benson et al., 2017](#)).

Construcción de árboles filogenéticos

Para aquellos géneros con mayor representación de individuos y especies (*Arthrodeis*, *Hegeter*, *Nesotes* y *Pimelia*), se realizaron árboles filogenéticos basados en distancias genéticas usando el método agloremativa “neighbour joining” ([Saitou y Nei, 1987](#)), implementado en Geneious 7.1.3. Estos árboles nos permitirán resolver incoherencias entre identificaciones morfológicas y moleculares, o aclarar relaciones interespecíficas dentro de estos géneros.

6. Resultados y discusión

Fotografías de las especies más representativas incluidas en el estudio

En la figura 5 se muestran algunos ejemplos de especies incluidas en nuestro estudio.



Figura 5. Representación de algunas especies de tenebriónidos incluidas en nuestro estudio.

Fotos tomadas del Banco de Datos de Biodiversidad de Canarias.

Evaluación del protocolo de *barcoding* para coleópteros

En el laboratorio se amplificaron 95 muestras, de las cuales 92 amplificaron correctamente, se observó una marcada banda de la longitud esperada en el gel de electroforesis (Figura 6).

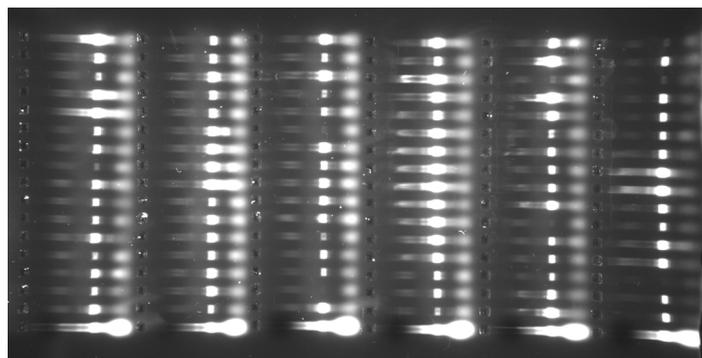


Figura 6. Gel de electroforesis

Tres muestras dieron resultados negativos debido a la ausencia de banda en el gel o a que ésta se presentaba de manera muy tenue. Para todas las muestras se usó la misma temperatura de anillamiento y una concentración inicial de ADN entre 1 ng/ul y 106,9 ng/ul. El éxito de amplificación es por tanto del 95,8%. Las tres muestras que no amplificaron corresponden a los códigos TENEb 009, TENEb 075 y TENEb 078 (Tabla 4). Pruebas

posteriores empleando diferentes volúmenes iniciales de ADN a distintas concentraciones no ofrecieron resultados positivos para estas 3 muestras, lo que permitiría descartar un efecto de la cantidad y concentración de posibles inhibidores de la enzima Taq polimerasa sobre el éxito de la amplificación.

Tabla 4. Muestras que no salieron amplificadas

Código de extracción	Taxón	Fecha de recolección
TENEB 009	<i>Arthrodeis punctatulus</i>	12-II-1997
TENEB 075	<i>Pimelia costata</i>	12-II-2019
TENEB 078	<i>Pimelia laevigata</i>	11-V-2019

En el caso del individuo *Arthrodeis punctatulus* puede que no amplifique de forma correcta debido a la antigüedad de la muestra, puesto que fué recolectada en 1997. Este factor junto a otros derivados de la mala conservación de los tejidos (cambios de temperatura, evaporación del etanol o conservación en etanol <100%) podrían explicar este resultado. Los especímenes pertenecientes a las especies *Pimelia costata* y *Pimelia laevigata* tampoco amplificaron. Estos problemas de amplificación se pueden solucionar empleando muestras más recientes y/o una alta concentración de ADN.

Pruebas posteriores empleando diferentes volúmenes iniciales de ADN (3 ó 4 ul) a distintas concentraciones (dilución 1:10) no ofrecieron resultados positivos para estas 3 muestras, lo que indicaría que la cantidad y concentración de posibles inhibidores de la enzima Taq polimerasa no supuso un efecto sobre el éxito de la amplificación. A pesar de que se emplean cebadores degenerados (es decir, determinadas posiciones tienen múltiples bases nucleotídicas), una posible acumulación de mutaciones en el ADN mitocondrial de estas muestras específicas podría explicar estos resultados. En el laboratorio se amplificaron 95 muestras, de las cuales 92 amplificaron correctamente (Figura 7).

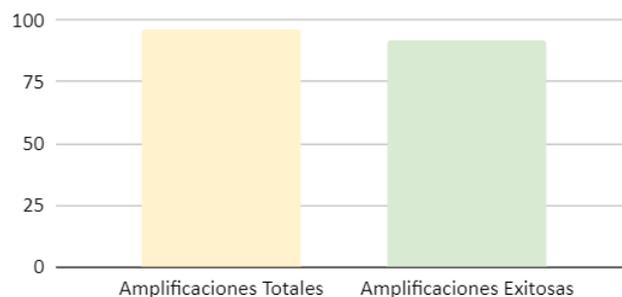


Figura 7. Amplificaciones totales y exitosas

De las 93 secuencias enviadas a secuenciación, se obtuvieron 85 secuencias de calidad (Figura 8). Las 11 restantes fueron descartadas puesto que eran secuencias que se observaba duplicidad de la señal o tenían una baja calidad (Figura 9) debido probablemente a la concentración baja de ADN del producto PCR.

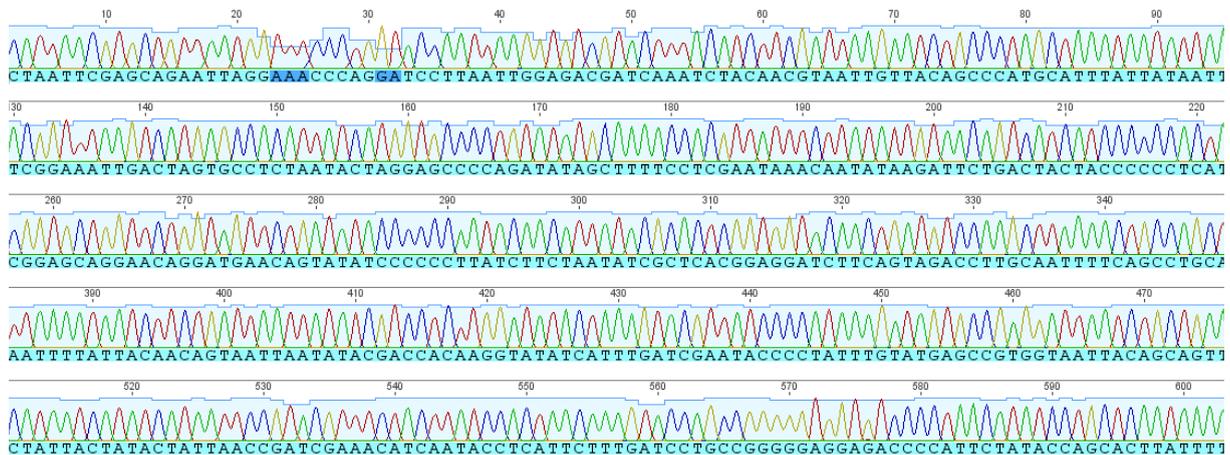


Figura 8. Secuencia de alta calidad correspondiente a la muestra *Crypticus nitidulus*

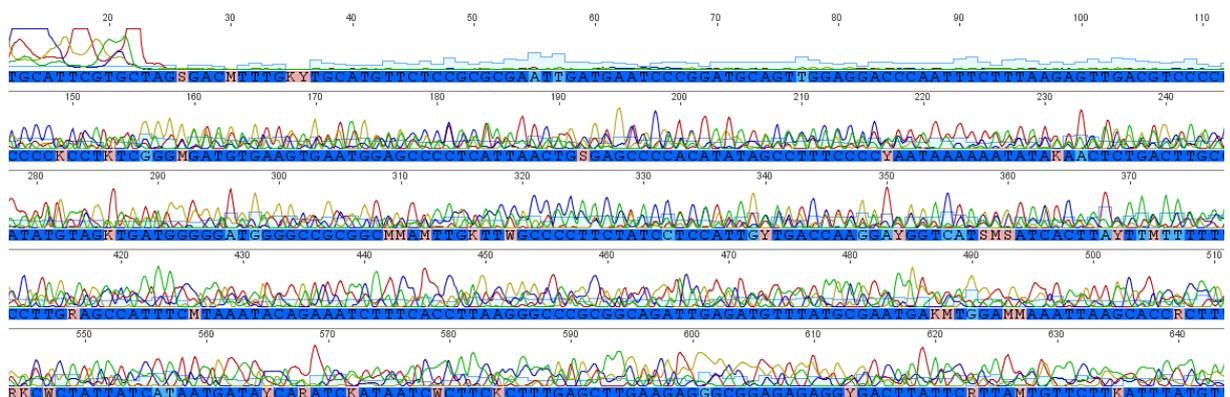


Figura 9. Secuencia de baja calidad correspondiente a la muestra *Arthrodeis malleatus*

Comparación con las bases de datos de referencia GenBank (NCBI) y BOLD

Se compararon las secuencias en las bases de datos tanto de GenBank como BOLD (Tabla 5) para confirmar la identidad taxonómica de las secuencias respecto a diferentes bases de datos y comprobar si coinciden o identifican otra especie diferente. A nivel de familia, en ambas bases de datos, la coincidencia era del 100%, lo que nos indica que no ha habido contaminación externa a nuestro sistema de estudio. A nivel de género difieren un

poco entre ambas, la coincidencia oscilaba entre el 88 y 96%, en BOLD coinciden 26 mientras que en GenBank coinciden 28. A nivel de género y especie, la coincidencia oscilaba entre el 90-95%, coinciden 2 muestras tanto en BOLD como en GenBank. Tenemos 70 nuevas secuencias en BOLD y 68 en GenBank.

El porcentaje de similitud es bajo entre las secuencias obtenidas en el estudio con las existentes en las bases de datos, esto significa que simplemente no existen en las bases de datos secuencias de nuestras especies.

Tabla 5. Resultados de similitud entre las secuencias obtenidas en el estudio y las existentes en las bases de datos del BOLD y GenBank

CÓDIGO EXTRACCIÓN	IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	BOLD	SIMILITUD BOLD	GenBank	SIMILITUD GenBank
TENEB006	<i>Crypticus nitidulus</i>	<i>Crypticus pyrenaicus</i>	87,77%	<i>Crypticus pyrenaicus</i>	87,77%
TENEB013	<i>Blaps alternans</i>	<i>Blaps gigas</i>	88,78%	<i>Blaps gigas</i>	88,78%
TENEB014	<i>Crypticus fernandezii</i>	<i>Crypticus quisquilius</i>	86,53%	<i>Crypticus quisquilius</i>	86,53%
TENEB015	<i>Crypticus navicularis calvus</i>	<i>Crypticus pyrenaicus</i>	87,06%	<i>Crypticus pyrenaicus</i>	87,06%
TENEB016	<i>Pimelia ascendens</i>	<i>Pimelia canariensis</i>	96,19%	<i>Pimelia canariensis</i>	96,19%
TENEB018	<i>Crypticus oblongus oblongus</i>	<i>Crypticus quisquilius</i>	87,04%	<i>Crypticus quisquilius</i>	87,04%
TENEB019	<i>Crypticus sp.</i>	<i>Crypticus pyrenaicus</i>	86,76%	<i>Crypticus pyrenaicus</i>	86,76%
TENEB021	<i>Crypticus sp.</i>	<i>Crypticus pyrenaicus</i>	87,44%	<i>Crypticus pyrenaicus</i>	87,44%
TENEB024	<i>Gonocephalum oblitum</i>	<i>Gonocephalum rusticum</i>	87,4%	<i>Gonocephalum oblitum</i>	87,4%
TENEB025	<i>Gonocephalum oblitum</i>	<i>Gonocephalum pubens</i>	87,41%	<i>Gonocephalum pubens</i>	87,41%

TENEB026	<i>Gonocephalum oblitum</i>	<i>Gonocephalum pubens</i>	87,54%	<i>Gonocephalum pubens</i>	87,54%
TENEB027	<i>Gonocephalum patruеле</i>	<i>Gonocephalum rusticum</i>	92,44%	<i>Gonocephalum rusticum</i>	92,44%
TENEB071	<i>Crypticus navicularis calvus</i>	<i>Crypticus pyrenaicus</i>	87,14%	<i>Crypticus pyrenaicus</i>	87,14%
TENEB073	<i>Pimelia ascendens</i>	<i>Pimelia canariensis</i>	95,94%	<i>Pimelia canariensis</i>	95,94%
TENEB075	<i>Pimelia costata</i>	<i>Pimelia rotundipennis</i>	89,74%	<i>Pimelia rotundipennis</i>	89,74%
TENEB076	<i>Pimelia estevezi</i>	<i>Pimelia canariensis</i>	91,2%	<i>Pimelia canariensis</i>	91,2%
TENEB077	<i>Pimelia granulicollis</i>	<i>Pimelia canariensis</i>	91,71%	<i>Pimelia canariensis</i>	91,71%
TENEB079	<i>Pimelia laevigata</i>	<i>Pimelia canariensis</i>	96,17%	<i>Pimelia canariensis</i>	96,17%
TENEB080	<i>Pimelia laevigata</i>	<i>Pimelia canariensis</i>	92,21%	<i>Pimelia canariensis</i>	92,21%
TENEB081	<i>Pimelia lutaria</i>	<i>Pimelia rugulosa</i>	90,23%	<i>Pimelia rugulosa</i>	90,23%
TENEB082	<i>Pimelia lutaria</i>	-		<i>Pimelia lutaria</i>	83,81%
TENEB083	<i>Pimelia lutaria</i>	-		<i>Pimelia lutaria</i>	83,81%
TENEB084	<i>Pimelia laevigata laevigata</i>	<i>Pimelia rugulosa</i>	89,48%	<i>Pimelia rugulosa</i>	89,48%
TENEB085	<i>Pimelia radula radula</i>	<i>Pimelia canariensis</i>	96,7%	<i>Pimelia canariensis</i>	96,7%
TENEB086	<i>Pimelia serrimargo</i>	<i>Pimelia</i>	91,89%	<i>Pimelia</i>	91,89%

	<i>albohumeralis</i>	<i>canariensis</i>		<i>canariensis</i>	
TENEB087	<i>Pimelia serrimargo serrimargo</i>	<i>Pimelia canariensis</i>	91,58%	<i>Pimelia canariensis</i>	91,58%
TENEB088	<i>Pimelia sparsa sparsa</i>	<i>Pimelia sparsa</i>	94,59%	<i>Pimelia sparsa</i>	94,59%
TENEB089	<i>Pimelia sparsa sparsa</i>	<i>Pimelia sparsa</i>	90,88%	<i>Pimelia sparsa</i>	90,88%

En las bases de datos GenBank y BOLD sobre las que se compararon con respecto a las secuencias de este trabajo casi no hay similitud, de hecho hay 70 nuevas secuencias en BOLD y 68 en GenBank, esto se puede explicar porque en trabajos anteriores de coleópteros de Canarias se utilizaba otro gen mitocondrial (citocromo b), explicando la ausencia de secuencias de barcode en ambas bases de datos. El hecho de que no sean similares las secuencias no implica necesariamente que la secuenciación se haya hecho mal, simplemente que no hay datos con los que comparar puesto que no hay estudios previos.

Nuestros resultados sugieren que pueden existir especies crípticas (Tabla 6). Se trataría de especies que están aisladas reproductivamente de otras especies pero no son distinguibles morfológicamente, y que podemos detectar empleando otras técnicas como los análisis de secuencia de ADN, como sería el caso de *Pimelia ascendens* o *Pimelia laevigata*, puesto que sólo difieren del taxón en al menos un 3-4%, nivel de divergencia genética.

Tabla 6. Posibles especies crípticas dentro del género *Pimelia*

CÓDIGO	TAXON	BOLD/NCBI	SIMILITUD
TENEB016	<i>Pimelia ascendens</i>	<i>Pimelia canariensis</i>	96,19%
TENEB073	<i>Pimelia ascendens</i>	<i>Pimelia canariensis</i>	95,94%
TENEB079	<i>Pimelia laevigata</i>	<i>Pimelia canariensis</i>	96,17%
TENEB081	<i>Pimelia lutaria</i>	<i>Pimelia rugulosa</i>	90,23%

El árbol filogenético de *Neighbor-Joining* del género *Pimelia* (Figura 10) muestra dos grandes grupos, las especies de Gran Canaria (y Lanzarote) -islas más orientales-, y las especies de El Hierro, La Palma y Tenerife -islas más occidentales-. Hay especies que no son monofiléticas como es *Pimelia sparsa sparsa*. Esto puede deberse a colonizaciones recientes entre islas, errores en la identificación morfológica, hay una especie críptica, bien la de Gran Canaria o la de La Palma, que se identifica como *Pimelia sparsa sparsa*, pero no lo es, o errores de laboratorio. La ausencia de monofilia puede justificarse debido a que el COI puede no ofrecer suficiente información para resolver relaciones filogenéticas entre especies que han sufrido procesos de diversificación recientes.

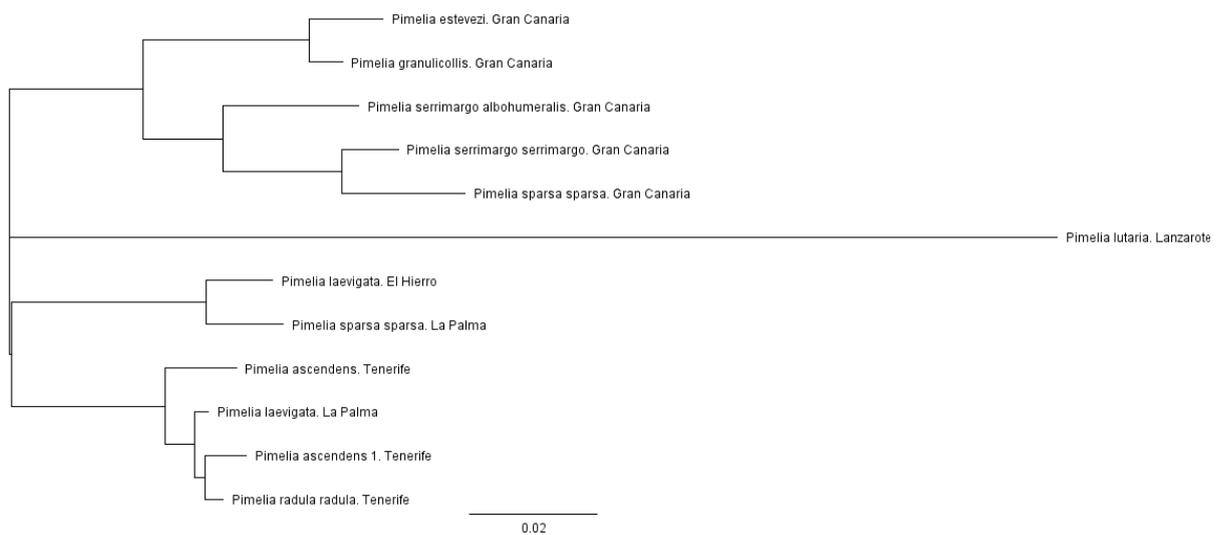


Figura 10. Árbol filogenético de *Neighbor-Joining* del género *Pimelia*

Este árbol solo incluye 10 de las 16 especies y subespecies descritas para este género, por lo que nuestra intención no es establecer las relaciones filogenéticas entre las especies, sino comprobar si nuestras secuencias aparecen agrupadas en clados monofiléticos, o si podemos detectar posibles errores de identificación taxonómica. En futuros estudios sería interesante combinar estas secuencias con las procedentes de estudios previos, para tratar de esclarecer la posibilidad de la existencia de especies crípticas, y establecer los patrones de colonización en las islas.

El árbol filogenético de *Nesotes* (Figura 11) muestra especies correspondientes a distintas islas Tenerife, La Palma, El Hierro y La Gomera, sin embargo no están emparentados según se trate de islas orientales u occidentales.

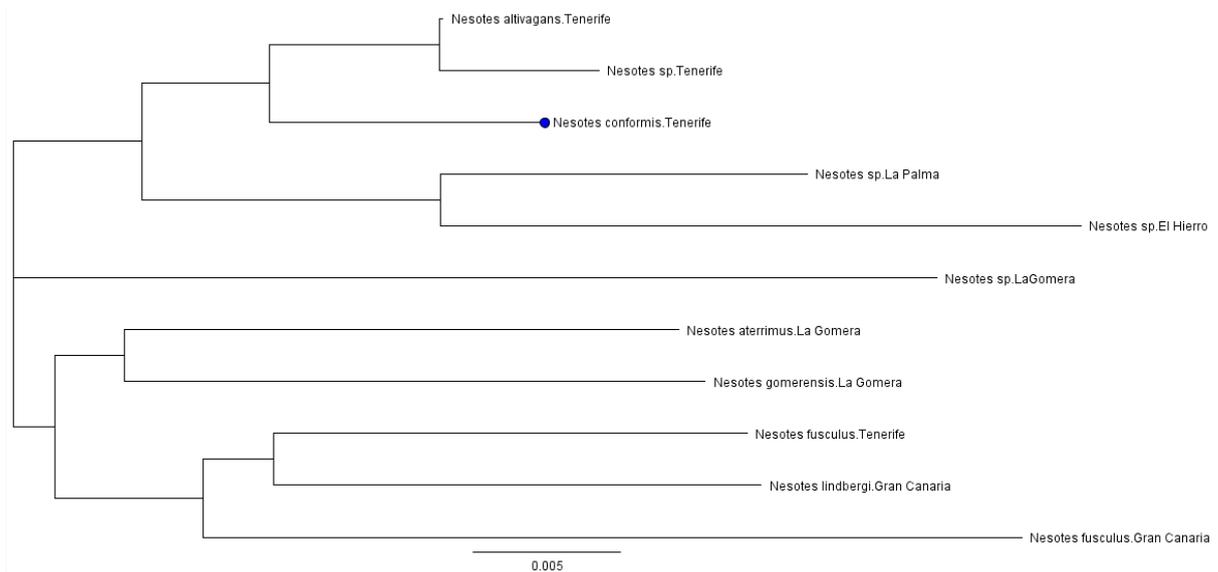


Figura 11. Árbol filogenético de *Neighbor-Joining* del género *Nesotes*

El árbol filogenético de *Hegeter* (Figura 12) muestra las relaciones filogenéticas de las distintas especies. Hay varias especies de *Hegeter tristis* en distintas islas y podría tratarse de especies crípticas puesto que no hay una relación directa entre ellas. En el caso de *Hegeter impressus* hay una relación directa entre ellas a pesar de haber representación en distintas islas. Lo mismo ocurre con *Hegeter deyrollei* salvo el que está en Fuerteventura que presenta un mayor parentesco en *Hegeter sp.*, morfológicamente sólo se identificó a nivel de género, con este trabajo podríamos asegurar que se trata de la especie *H. deyrollei* de la misma isla. En el caso de *Hegeter sp.* están emparentados en las islas occidentales (Tenerife y La Gomera) y es probablemente otra especie diferente a la que aparece en Fuerteventura, pero al no estar emparentada con otra que sí esté identificada a nivel específico, no podemos decir cuál podría ser.

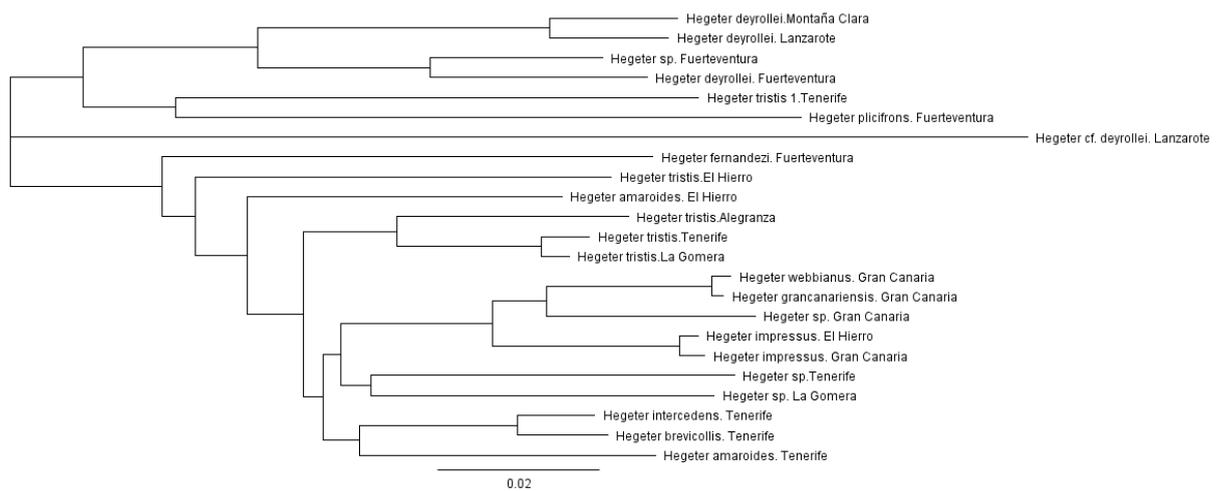


Figura 12. Árbol filogenético de *Neighbor-Joining* del género *Hegeter*

El árbol filogenético del género *Arthrodeis* (Figura 13), es un ejemplo donde el patrón filogeográfico no está tan claro. Esto puede deberse a procesos colonización reciente entre islas, o simplemente a que no se incluyen todas las especies del género.

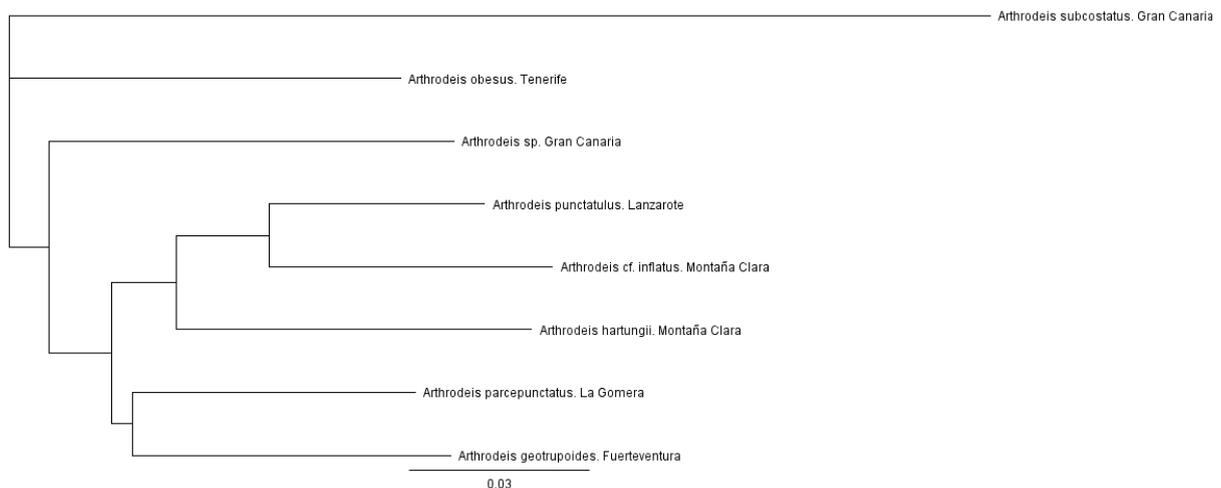


Figura 13. Árbol filogenético de *Neighbor-Joining* del género *Arthrodeis*

Estos son árboles filogenéticos han sido realizados solo con un gen mitocondrial, con muchas limitaciones, ya que permiten ver si alguna especie es más similar a otra, o ver si puede haber varias especies que no estén bien delimitadas y no aparezcan monofiléticas. Sin embargo, la intención de este TFG no es aclarar las relaciones filogenéticas de este grupo, ya

que para ello habría que analizar y combinar otros genes mitocondriales y nucleares, además de hacer análisis más exhaustivos.

Sin embargo no debemos olvidar la importancia de la morfología ya que las inferencias obtenidas de DNA *barcoding* pueden estar limitadas por inexactitud de las limitaciones como la calidad en las identificaciones específicas debido al hecho de que las bases de datos de secuencias de referencias son incompletas y sesgadas hacia determinadas grupos de organismos y regiones geográficas. Por ello es muy importante que ambas técnicas (morfológica y molecular) sean utilizadas de forma comparativa a nivel de organismo.

7. Conclusiones

En este trabajo se ha optimizado el protocolo de laboratorio para secuenciar los *barcodes* de especies de Tenebrionidae de Canarias, con un alto porcentaje de éxito en las amplificaciones y secuencias obtenidas, lo que permitirá continuar con futuros estudios dentro del grupo. Con los resultados obtenidos en este trabajo llegamos a la conclusión que en el caso de la familia Tenebrionidae e no se obtienen grandes similitudes entre nuestras secuencias y las bases de datos de secuencias de barcode. principalmente porque estudios anteriores con este grupo en Canarias no usaron esta región de COI del *barcode*, sino otro fragmento (citocromo b). Por tanto a la hora de buscar en las bases de datos de BOLD y GenBank las identificaciones moleculares no coinciden con las taxonómicas.. En este estudio hemos generado xx nuevas secuencias no incluidas en ninguna base de datos de *barcode*, además de identificar a nivel de especie algunas identificaciones realizadas solo a nivel de género. Por tanto, el DNA *barcoding* es una técnica que permite identificar y descubrir nuevas especies. Es muy útil puesto que nos permite delimitar especies de géneros conocidos. Sin embargo, esta técnica puede dar lugar a discrepancias con la taxonomía clásica basada en caracteres morfológicos. Por esto es muy importante que ambas técnicas sean utilizadas de forma comparativa a nivel de organismo.

Además, se tomaron fotos de los ejemplares para tener una base de fotografías para futuras identificaciones y subir las fotos a BOLD junto con su secuencia correspondiente. De esta manera, cualquier investigador, aún cuando no sea especialista en taxonomía, será capaz de identificar de forma correcta una especie.

8. Conclusions

We can conclude that the results obtained for the Tenebrionidae Family are not quite representative. This is the consequence of the lack of representative data in the Canary Islands by using the cytochrome b fragment instead of the COI region of the barcode. Subsequently, when looking up information in both databases (BOLD and GenBank), the molecular identifications don't match with the taxonomical ones.

Due to the information above, we can confirm that the DNA barcoding is an usual tool that allows the researcher to identify and discover new species, because it delimitates species from unknown genus. Nevertheless, this technique can cause discrepancies related with the traditional morphological taxonomy. This is why it is so important to use both techniques in a comparative way in the organism category.

Photographs of the samples were taken to create a photographic database for future research and to upload those pictures with its corresponding BOLD sequence. This will allow any researcher even though they are not specialists in this field, to correctly identify the species.

9. Bibliografía

Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J et al. 2017. GenBank. Nucleic Acids Research **45(D1)**:D37-D42.

Biota. (s. f.). Biota . <https://www.biodiversidadcanarias.es/biota/>

Boratyn, G.M., Camacho. C., Cooper. P.S., Coulouris. G., Fong. A., et al. 2013. BLAST: a more efficient report with usability improvements. Nucleic Acids Research **41(W1)**:W29-33.

Carracedo, J. C., Day, S., Guillou, H., Rodríguez-Badiola, E., Canas, J. A., Perez-Torrado, F. J., & Belmonte Avilés, J. A. 1998. *Origen y evolución del volcanismo de las Islas Canarias*. Museo de la Ciencia y el Cosmos. Cabildo de Tenerife.

Chapman, A. D. 2009. *Numbers of living species in Australia and the world*. 2ª edición. Australia.

Del Arco Aguilar, M. J., & Rodríguez Delgado, O. 2018. *Vegetation of the Canary Islands* (Vol. 16). Springer.

Favero, S., Souza, H.A. & Oliveira, A.K.M. 2010. Coleoptera (Insecta) as forest fragmentation indicators in the Rio Negro sub-region of the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. Brazilian Journal of Biology **71(1)**, 291-295.

Frézal, L., & Leblois, R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. Infection, Genetics and Evolution **8(5)**: 727-736.

Gaston, K. J., & Spicer J. I. 1998. *Biodiversity. An introduction*. Blackwell Science. Malden, EEUU.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., & Ball, S. L. 2003. Barcode of Life: Identifying Species with DNA Barcoding Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences **270(1512)**: 313-321.

Hebert, P. D., & Gregory, T. R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. Systematic Biology **54(5)**: 852-859.

Ornosa, C., Tello, A., Romero, D. 2021. *Análisis de la situación y propuestas para la conservación de los insectos*. Madrid.

Oromí, P., Zurita, N., Morales, E., & López, H. 2015. Diversidad de artrópodos terrestres en las Islas Canarias. *Revista IDE@, Ibero Diversidad Entomológica@ ccesible*, **4**: 1-14.

Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; et al. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28(12)**: 1647–1649.

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* **7**: 355-364.

Saitou, N., & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. 1987. *Molecular Biology and Evolution* **4(4)**: 406–425.

Stork, N. E. 2018. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth. *Annual review of Entomology* **63(1)**: 31-45.

Lawrence, J., & Ślipiński, A. 2013. *Australian Beetles, Volume 1, Morphology, classification and Keys*. Collingwood, Vic: CSIRO Publishing. Australia.

Lee, C. W., & Burgess, C.J. 1978. Sedimentation and tectonic controls in the Early Jurassic Central High Atlas trough, Morocco. *Geological Society of America Bulletin* **89(8)**: 1199-1204.

Marinoni, L.B., & Pasquarè, G. 1994. Tectonic evolution of the emergent part of a volcanic ocean island: Lanzarote, Canary Islands. *Tectonophysics* **239(1-4)**: 111-137.

McGavin, G. C. 2002 *Insects, spiders and other terrestrial arthropods. 2ª edición. Editorial Dorling Kindersley*. United States of America.

Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G., & Worm, B. 2011. How many species are there on Earth and in the ocean?. *PLoS Biology* **9(8)**: e1001127.

Morales, G. 2001. Las Islas Canarias ¿Una región aislada?. Boletín de la A.G.E. **32**: 155-175
<http://hdl.handle.net/10016/13217>

Noriega, J. A., et al. 2015. ¿Cuál es el alcance de la crisis de la Taxonomía? Conflictos, retos y estrategias para la construcción de una Taxonomía renovada. Revista IDE@-SEA, **9**: 1-16.

Wheeler, Q. D. 2008. *The New Taxonomy*. 1ª edición. CRC Press . Ç

Wilson, E. O. 1985. Time to revive systematics. Science **230(4731)**: 1227-1227.

Winston, J. E. 1999. *Describing species: practical taxonomic procedure for biologists*. Columbia University Press.

Yu, D.W., Ji, Y., Emerson, B.C., Wang, X., Ye, C., Yang, C. & Ding, Z. 2012. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. Methods in Ecology and Evolution **3(4)**: 613-623.

Zhang, S. Q., Che, L. H., Li, Y., Liang, D., Pang, H., Ślipiński, A., & Zhang, P. 2018. Evolutionary history of Coleoptera revealed by extensive sampling of genes and species. Nature Communications **9(1)**: 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02644-4>

Zumbado-Arrieta, M., & Azofeifa-Jiménez, D. 2018. *Insectos de importancia agrícola*. Guía Básica de Entomología. Heredia, Costa Rica. Programa Nacional de Agricultura Orgánica (PNAO).